



(11) Numéro de publication : **0 677 582 A1**

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **95400592.2**

(22) Date de dépôt : **17.03.95**

(51) Int. Cl.⁶ : **C12N 15/12, C12Q 1/68,
C07K 14/74, G01N 33/569,
C07K 16/28, A61K 38/17**

(30) Priorité : **18.03.94 FR 9403179**

(43) Date de publication de la demande :
18.10.95 Bulletin 95/42

(84) Etats contractants désignés :
CH DE FR GB LI NL

(71) Demandeur : **COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE (CEA)
Etablissement Public,
31-33, rue de la Fédération
F-75015 Paris (FR)**

(72) Inventeur : **Carosella, Edgardo Delfino
23, rue George Sand
F-75016 Paris (FR)
Inventeur : Moreau, Philippe
8, rue Bougainville
F-91170 Viry-Chatillon (FR)
Inventeur : Gluckman, Eliane
70, Boulevard Port Royal
F-75005 Paris (FR)
Inventeur : Kirszenbaum, Marek
Résidence de la Colline -C,
rue François Leroux
F-91400 Orsay (FR)**

(74) Mandataire : **Orès, Bernard et al
Cabinet ORES
6, Avenue de Messine
F-75008 Paris (FR)**

(54) **Transcrits du gène de CMH de classe I HLA-G et leurs applications.**

(57) Transcrits du gène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I HLA-G, présents dans les trophoblastes fœtaux et/ou dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte ainsi que leurs applications. Soit lesdits transcrits ne comprennent pas l'exon 4 et comprennent successivement de 5' en 3' : un fragment codant pour le peptide signal (exon 1), un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2), un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3), un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5), un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et le fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dénommée HLA-G4 ; soit lesdits transcrits comprennent un intron 4.

EP 0 677 582 A1

BEST AVAILABLE COPY

La présente invention est relative à des transcrits du gène du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I HLA-G, présents dans les trophoblastes foetaux et/ou dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte ainsi qu'à leurs applications.

Les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), se divisent en plusieurs classes, les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) qui présentent 3 domaines globulaires ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$), et dont le domaine $\alpha 3$ est associé à la $\beta 2$ microglobuline, les antigènes de classe II ((HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR) et les antigènes de classe III (complément).

Les antigènes de classe I comprennent, outre les antigènes précités, d'autres antigènes, dits antigènes de classe I non classiques, et notamment les antigènes HLA-E, HLA-F et HLA-G ; ce dernier, en particulier, est exprimé par les trophoblastes extravilleux du placenta humain normal.

La séquence du gène HLA-G (gène HLA-6.0) a été décrite par GERAGHTY et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 9145-9149) : il comprend 4396 paires de bases et présente une organisation intron/exon homologue à celle des gènes HLA-A, -B et -C. De manière plus précise, ce gène comprend 8 exons et une extrémité non traduite 3'UT, correspondant respectivement : exon 1 : séquence signal, exon 2 : domaine $\alpha 1$, exon 3 : domaine $\alpha 2$, exon 4 : domaine $\alpha 3$, exon 5 : région transmembranaire, exon 6 : domaine cytoplasmique I, exon 7 : domaine cytoplasmique II, exon 8 : domaine cytoplasmique III et région 3' non traduite (GERAGHTY et al., précité, ELLIS et al., J. Immunol., 1990, 144, 731-735). Toutefois le gène HLA-G diffère des autres gènes de classe I, en ce que le codon de terminaison de traduction, en phase, est localisé au niveau du deuxième codon de l'exon 6 ; en conséquence, la région cytoplasmique de la protéine codée par ce gène HLA-6.0 est considérablement plus courte que celle des régions cytoplasmiques des protéines HLA-A, -B et -C.

Contrairement aux autres antigènes de classe I, cet antigène HLA-G (clones G 6.0 et BeWO.G7) ne serait pas polymorphique et ne serait pas exprimé dans d'autres types cellulaires que les trophoblastes (ELLIS et al., J. Immunol., 1990, précité).

D'autres clones HLA-G ont été isolés (TAMAKI et al., Microbiol. Immunol., 1993, 37, 8, 633-640) ; en particulier, le clone HLA-G, dénommé 7.0E, a été isolé d'un placenta japonais et sa séquence en acide aminé s'est révélée identique à celle des clones précités G6.0 et BeWO.G7. Les Auteurs de cet article montrent, en outre, qu'il peut exister une certaine hétérogénéité dans les gènes HLA-G.

Ces antigènes HLA-G sont essentiellement exprimés par les cellules cytotrophoblastiques du placenta ; toutefois, l'ARNm HLA-G a été retrouvé dans les tissus de l'oeil et dans le foie foetal (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951 ; dont la numérotation correspond à celle de la séquence HLA 6.0 telle que décrite dans SHUKLA et al., Nucleic Acids Research, 1990, 18, 8, 2189).

Les antigènes HLA-G exprimés par les cytotrophoblastes sont considérés comme jouant un rôle dans la protection du placenta (absence de rejet). En outre, dans la mesure où l'antigène HLA-G est monomorphique, il peut également être impliqué dans la croissance ou la fonction des cellules placentaires (KOVATS et al., Science, 1990, 248, 220-223).

D'autres recherches concernant cet antigène non classique de classe I (ISHITANI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 3947-3951) ont montré que le transcrit primaire du gène HLA-G peut être épissé de plusieurs manières et produit au moins 3 ARNm matures distincts : le transcrit primaire d'HLA-G fournit une copie complète (G1) de 1 200 bp, un fragment de 900 bp (G2) et un fragment de 600 bp (G3).

Le transcrit G1 ne comprend pas l'exon 7 et correspond à la séquence décrite par ELLIS et al. (précité), c'est-à-dire qu'il code pour une protéine qui comprend une séquence leader, trois domaines externes, une région transmembranaire et une séquence cytoplasmique. L'ARNm G2 ne comprend pas l'exon 3, c'est-à-dire qu'il code pour une protéine dans laquelle les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont directement joints ; l'ARNm G3 ne contient ni l'exon 3, ni l'exon 4, c'est-à-dire qu'il code pour une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 1$ et la séquence transmembranaire sont directement joints.

L'épissage qui prévaut pour l'obtention de l'antigène HLA-G2 entraîne la jonction d'une adénine (A) (provenant du domaine codant pour $\alpha 1$) avec une séquence AC (issue du domaine codant pour $\alpha 3$), ce qui entraîne la création d'un codon AAC (asparagine) à la place du codon GAC (acide aspartique), rencontré au début de la séquence codant pour le domaine $\alpha 3$ dans HLA-G1.

L'épissage généré pour l'obtention de HLA-G3 n'entraîne pas la formation d'un nouveau codon dans la zone d'épissage.

Les Auteurs de cet article ont également analysés les différentes protéines exprimées : les 3 ARNm sont traduits en protéine dans la lignée cellulaire 221-G.

Les Auteurs de cet article concluent à un rôle fondamental de l'HLA-G dans la protection du placenta vis-à-vis d'une réponse immunitaire maternelle (induction d'une tolérance immunitaire). Toutefois, il est précisé que le rôle de la protéine G3, qui ne contient pas le domaine $\alpha 3$ n'est pas établi.

La complexité du CMH et le rôle de l'antigène HLA-G dans les mécanismes de tolérance ont conduit les Inventeurs à rechercher au moins un transcrit HLA-G, qui pourrait à la fois :

- aisément être mis en évidence dans le sang périphérique,
- serait apte à exprimer, dans des conditions appropriées, une protéine convenable, de préférence soluble, en tant qu'agent de tolérance,
- permettrait de sélectionner des cellules souches immatures aptes à être utilisées dans des greffes de moelle osseuse,
- et permettrait également de mettre en évidence dans le sang maternel, des cellules foetales dans lesquelles ce gène s'exprime.

En conséquence, la présente invention s'est donné pour but de pourvoir à des séquences issues d'un ARNm du gène HLA-G, aptes à résoudre l'ensemble des problèmes exposés ci-dessus.

De telles séquences trouvent application notamment :

- dans la séparation, dans un échantillon de sang maternel, des cellules foetales,
- dans un procédé d'enrichissement en cellules souches immatures, aptes à être utilisées dans les greffes de la moelle et
- dans la séparation spécifique des cellules mononucléées circulantes
- et dans la préparation d'un médicament immunomodulateur.

La présente invention a pour objet une séquence d'ADNc, issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), caractérisée en ce qu'elle comprend successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dénommée HLA-G 3-5 ou selon les conventions actuellement en vigueur HLA-G4.

Une telle séquence a la particularité de ne pas inclure l'exon 4 et de présenter l'ensemble des propriétés énumérées ci-dessus, et d'être notamment détectable dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte.

On entend par séquences mononucléées, toutes les cellules mononucléées du sang périphérique, à l'exception des cellules tueuses (cellules NK et autres LGL (*large granular lymphocytes*)).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite séquence comprend successivement de 5' en 3' :

- le fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- le fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- le fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8).

Conformément à l'invention, une telle séquence qui code pour une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 2$ et la séquence transmembranaire HLA-G sont directement joints, présente la SEQ ID NO: 1 suivante :

```

CC AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC
GTG GAG TGG CTC CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG
CAG CGC GCG G3/5AG CAG TCT TCC CTG CCC ACC ATC CCC ATC ATG
GGT ATC GTT GCT GGC CTG GTT GTC CTT GCA GCT GTA GTC ACT GGA
GCT GCG GTC GCT GCT GTG CTG TGG AGX1 AAG AAG AGC TCA G5/6AT
TGA AAA GGA GGG AGC TAC TCT CAG GCT GCA A6/8TG TGA8/
AACAGCTGCCCTGTGTGGGACTGAGTGGCAAGTCCCTTTGTGACTTCAAGA
ACCCTGACTTCTCTTTX2TGCAGAGACCAGCCCACCCCTGTGCCCACCATGA
CCCTCTTX3CTCATGCTGAACTGCATTCCTTCCCCAATCACCTTTCCTGTTCC
AGAAAAGGGGCTGGGATGTCTCCGTCTCTGTCTCA

```

dans laquelle

- X₁ représente G ou A,
- X₂ représente C ou G,
- X₃ représente T ou C,

et comprend 0,43 kb.

De manière inattendue, un tel transcrit est détecté aussi bien dans les trophoblastes (premier trimestre de gestation) que dans les cellules mononucléées circulantes chez l'adulte.

La présente invention a également pour objet un produit de transcription du gène HLA-G humain du CMH, caractérisé en ce qu'il inclut, à partir de l'extrémité 5' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5), et
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) de HLA-G et en ce qu'il comprend 0,43 kb.

La présente invention a également pour objet des fragments oligonucléotidiques de la séquence, ne comprenant pas l'exon 4, conforme à l'invention ; parmi ces fragments, dont la numérotation correspond à celle de la séquence HLA 6.0, telle que décrite dans SHUKLA et al. précité, on peut citer :

- GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA (SEQ ID NO: 2),

dénommé G.257 (+), situé au niveau de l'exon 2 et correspondant au fragment 257-276 de ladite séquence d'ADNc ;

- CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG (SEQ ID NO: 3),

dénommé G.526 (+), situé au niveau de l'exon 3 et correspondant au fragment 526-545 de ladite séquence d'ADNc ;

- CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA (SEQ ID NO: 4),

dénommé G. 1200 (-) et correspondant au fragment 1200-1219 de ladite séquence d'ADNc ;

- TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (SEQ ID NO: 5),

dénommé G.1225 (-) et correspondant au fragment 1225-1244 de ladite séquence d'ADNc ;

- CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC (SEQ ID NO: 6),

dénommé G.3.5 (+) et correspondant à la jonction exon 3-exon 5 de ladite séquence d'ADNc.

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite sonde, elle présente la séquence ID NO: 6 ci-dessus, spécifique du transcrit, sans exon 4, conforme à l'invention.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite sonde, elle présente la séquence ID NO: 4 ci-dessus ; une telle sonde est apte à détecter tous les produits de transcription du gène HLA-G humain du CMH.

La présente invention a également pour objet des amorces, aptes à être utilisées pour amplifier une séquence nucléotidique conforme à l'invention, telle que définie ci-dessus (séquence sans exon 4).

Selon un mode de réalisation avantageux desdites amorces, une paire d'amorces préférée comprend :

(1) GGA AGA GGA GAC ACCG GAA (SEQ ID NO: 2)

(2) TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (SEQ ID NO: 5).

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites amorces, une autre paire d'amorces préférée comprend :

(3) CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG (SEQ ID NO: 3)

(4) TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT (SEQ ID NO: 5).

Egalement de manière inattendue, les Inventeurs ont trouvé que d'autres transcrits peuvent être détectés

dans les cellules mononucléées circulantes l'adulte.

Parmi ces transcrits, on peut citer :

a) le transcrit dénommé HLA-G5, comprenant successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 3$ (exon 4),
- l'intron 4,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8).

La présence de l'intron 4, entre les exons 4 et 5, provoque une modification du cadre de lecture, lors de la traduction de ce transcrit et en particulier l'apparition d'un codon stop, après l'acide aminé 21 de l'intron 4 ; de ce fait, la protéine codée par ce transcrit, ne présente pas de domaine transmembranaire codé par l'exon 5, ni de domaine cytoplasmique, codé par l'exon 6 et fournit donc une protéine soluble, facile à obtenir à partir des cellules mononucléées circulantes et ayant des propriétés d'immunomodulation intéressantes,

Ce transcrit vient également d'être détecté dans les trophoblastes (J. Immunol. p. 5516-5524, 1994) ; cependant, l'expression de ce transcrit par les cellules mononucléées fournit, de manière inattendue, un outil d'étude, d'analyse et d'action sur l'immunomodulation.

b) le transcrit, dénommé HLA-G6, possédant l'intron 4, mais ayant perdu l'exon 3.

c) des transcrits, tels que définis ci-dessus, en a) ou en b), sans exon 6 et/ou sans exon 8.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de protéines solubles immunomodulatrices, caractérisé, en ce qu'il comprend la construction d'un vecteur d'expression dans lequel est insérée une séquence avec intron 4, issue de cellules mononucléées circulantes d'adultes, telle que définie ci-dessus et l'expression desdites protéines solubles.

Les vecteurs d'expression de la famille pBJ peuvent être utilisés. [B. DEVAUX et al., *Generation of monoclonal antibodies against soluble human T cell receptor polypeptides*, Eur. J. Immunol., 1991, **21**, 2111-2119 ; V. LITWIN et al., *Receptor Properties of two Varicella-Zoster Virus glycoproteins, gpl and gpIV, Homologous to Herpes Simplex Virus gE and gI*, J. Virol., 1992, **66**, 3643-3651 ; A.Y. LIN, *Expression of T Cell Antigen receptor Heterodimers in a Lipid-Linked form*, Science, 1990, **249**, 677-679].

La présente invention a également pour objet des peptides ou fragments peptidiques, caractérisés en ce qu'ils sont codés par au moins un fragment tel que défini ci-dessus ou une portion de fragment ou une combinaison de plusieurs fragments tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est codé par un fragment du transcrit HLA-G4 et répond à la SEQ ID NO: 7 ci-après :

Asn-Val-Ala-Glu-Gln-Arg-Arg-Ala-Tyr-Leu-Glu-Gly-Thr-Cys-Val-Glu-Trp-Leu-His-
Arg-Tyr-Leu-Glu-Asn-Gly-Lys-Glu-Met-Leu-Gln-Arg-Ala-Glu-Gln-Ser-Ser-Leu-Pro-
Thr-Ile-Pro-Ile-Met-Gly-Ile-Val-Ala-Gly-Leu-Val-Val-Leu-Ala-Ala-Val-Val-Thr-Glu-
Ala-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Leu-Trp-Arg-Lys-Lys-Ser-Ser-Asp.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est codé par un fragment du transcrit HLA-G5 et répond à la SEQ ID NO: 8 :

Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg
 Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr
 His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro
 5 Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu
 Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro
 Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu
 10 Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu Gly Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser
 Leu Ser Glu Asp Leu.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit peptide est codé par un fragment du transcrit
 15 HLA-G6 et répond à la SEQ ID NO: 9 :

Gln Ser Glu Ala Asn Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu
 20 Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln

Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp
 Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr
 25 Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu gly
 Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser Leu Ser Glu Asp Leu.

Selon un autre mode de réalisation avantageux des peptides conformes à l'invention, ils peuvent être ob-
 30 tenus par synthèse.

Conformément à l'invention, de tels peptides trouvent application en tant que médicaments, notamment
 dans des compositions immunomodulatrices.

La présente invention a également pour objet un procédé de sélection et d'enrichissement en cellules hé-
 35 matopoïétiques indifférenciées (cellules sanguines immatures ou cellules souches), caractérisé en ce qu'il
 comprend :

- (a) le prélèvement d'un échantillon sélectionné, selon le cas, parmi le sang périphérique, le sang de cordon
 ombilical ou la moelle osseuse,
- (b) la mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-CD34, (DYNABEADS ; DYNAL/BIOSYS,
 Compiègne, France)
- 40 (c) la séparation des complexes cellules contenant un antigène CD34-anticorps anti-CD34 formés,
- (d) la réalisation d'une RT-PCR *in situ* sur les cellules obtenues à l'étape (c) en présence d'une paire
 d'amorces marquées à l'aide d'un fluorochrome, conforme à l'invention,
- (e) la séparation des cellules fluorescentes, et
- (f) la sélection des cellules non fluorescentes immatures pluripotentes.

45 Les cellules obtenues en (f) sont des cellules CD34⁺ HLA-G⁻, qui sont les cellules les plus immatures. Un
 tel procédé permet avantageusement d'obtenir un grand nombre de cellules souches immatures aptes à être
 utilisées pour des greffes de cellules souches.

Selon un mode de mise oeuvre avantageux dudit procédé, la paire d'amorces est sélectionnée parmi les
 paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.

50 La présente invention a également pour objet un procédé de détection de cellules exprimant le transcrit
 HLA-G4, conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR,
 par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention,
 sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.
 - 55 (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.
- La RT-PCR est notamment décrite dans American J. Pathol., 1993, 143, 6, 1527-1534.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de cellules sanguines et plus par-
 ticulièrement de cellules mononucléées circulantes d'adultes, exprimant un transcrit comprenant l'intron 4, ca-

ractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

(a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention, sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) telles que définies ci-dessus.

(b) sélection des transcrits comprenant l'intron 4, par hybridation avec une sonde, éventuellement marquée, sélectionnée parmi la sonde de SEQ ID NO: 10 5'-GAGGCATCATGTCTGTTAGG (dénommée G.i4A) et la sonde de SEQ ID NO: 11 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG (dénommée G.i4B) et

(b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.

La présente invention a également pour objet des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G telles que définies ci-dessus.

De manière préférée, de tels anticorps sont obtenus par immunisation d'un animal approprié, avec des peptides selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de séparation de cellules foetales nucléées, à partir d'un échantillon de sang maternel, caractérisé en ce qu'il comprend :

(1) la mise en contact de l'échantillon de sang maternel avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G telles que définies ci-dessus, et

(2) la séparation des complexes cellules foetales-anticorps obtenus.

Un tel procédé permet le dépistage prénatal d'anomalies foetales et notamment d'aberrations chromosomiques ou d'aberrations géniques et un dépistage prénatal du sexe, à partir des cellules foetales circulantes ainsi isolées, de manière fiable, de la circulation sanguine maternelle, dans la mesure où seules ces cellules foetales sont porteuses desdites protéines HLA-G.

La présente invention a également pour objet un procédé de séparation spécifique de cellules mononucléées circulantes, caractérisé en ce qu'il comprend, la mise en oeuvre d'une RT-PCR *in situ*, par :

(a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées conforme à l'invention et

(b) séparation des cellules marquées (cytofluorométrie...).

Un tel procédé permet, si nécessaire, de séparer en outre les cellules mononucléées n'exprimant pas le gène HLA-G (cellules tueuses, notamment) des autres cellules mononucléées.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Les protéines, exprimées par les transcrits tels que définis ci-dessus, ont également pour fonction de servir à la reconnaissance des récepteurs CD8 sur les cellules T cytotoxiques et jouent donc un rôle dans la surveillance immunitaire. Au niveau de l'interface materno-foetal, cette forme sécrétée pourrait bloquer la reconnaissance de structures cibles n'appartenant pas au complexe majeur d'histocompatibilité et supprimer ainsi la cytotoxicité humaine (tolérance, comme précisé ci-dessus).

La présente invention a donc en outre pour objet un procédé de détection de récepteurs CD8, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules mononucléées avec un peptide tel que défini ci-dessus et en ce que l'on détecte les complexes CD8-peptides, par tout moyen approprié (notamment formation d'un complexe antigène-anticorps).

En outre, seules les cellules NK (ou cellules tueuses) n'expriment pas l'ARNm d'HLA-G ; ceci montre que les produits d'expression du gène HLA-G protègent contre l'activité lytique des cellules NK.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Transcrit du gène HLA-G épissé, sans exon 4.

a) Obtention des cellules adultes et des tissus foetaux :

- Les trophoblastes du premier trimestre de gestation sont obtenus lors d'IVG (6-10 semaines de gestation).

- Les foies foetaux du deuxième trimestre sont obtenus, lors d'interruptions thérapeutiques de grossesse (16 semaines de gestation).

Les tissus sont lavés dans un tampon PBS et les trophoblastes ou le foie sont identifiés au microscope et congelés dans de l'azote liquide.

- Des échantillons de sang périphérique humain sont obtenus chez des volontaires (homme normal).

Les cellules mononucléées sont séparées des polynucléaires par centrifugation de densité (Ficoll-Hypaque®) et l'ARNm est isolé des deux populations.

On obtient également des cellules mononucléées enrichies en lymphocytes B par immunoabsorption sur billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD19 (Dynabeads-Dynal/Biosys, France) et des cellules mo-

nonucléées enrichies en lymphocytes T, par séparation sur Leuko-Pac® (Fenwal Laboratories, USA).

L'enrichissement est d'environ 90 % pour les cellules B et d'environ 87 % pour les cellules T, après estimation par analyse FACS : évaluation des complexes formés respectivement avec des anticorps anti-CD20 ou des anticorps anti-CD3, marqués au FITC et 1.10^5 cellules de chaque sous-population.

b) Isolement de l'ARN et amplification par RT-PCR :

L'ARNm total est isolé à partir d'1 g de tissu congelé ou de 2.10^7 cellules, en utilisant le réactif RNA-Zol B® (Bioprobe Systems, France), conformément aux recommandations du fabricant ; la qualité du produit obtenu est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant à 1,5 %.

L'ADNc est préparé à partir de 10 µg d'ARN total, en présence d'amorce oligo-dT et de transcriptase réverse M-MLV (Gibco-BRL, Life Technologies), par incubation de 20 µl du mélange à 42°C pendant 1 heure, puis à 95°C pendant 5 minutes.

Les fragments PCR qui peuvent être obtenus selon les amorces utilisées (voir Tableau I ci-après), sont représentés à la figure 1.

Pour amplifier le transcrit G.3-5 (maintenant dénommé HLA-G4) conforme à l'invention (fragment de 0,43 kb), on utilise de préférence les amorces G.526 et G.1225 (représentées par des flèches horizontales) ; la sonde utilisée pour détecter ce transcrit amplifié est la sonde G.3-5 (représentée par une ligne épaisse).

Les flèches verticales indiquent les sites de restriction spécifiques des exons 3, 4 et 5, utiles pour l'analyse de restriction des produits de la RT-PCR, clonés dans le vecteur pPCRII (B : BglI ; St : StuI ; Ss : SstI).

TABLEAU I

| Amorce | Séquence 5'→3' | Localisation ADNc ADN génomique |
|--------------------------------|--------------------------------|--|
| G.257 (+) (SEQ ID NO:2) | GGA AGA GGA GAC ACCG GAA CA | 257-276 Ex 2 |
| G.526 (+) (SEQ ID NO:3) | CCA ATG TGG CTG AAC AAA GG | 526-545 Ex 3 |
| G.1200 (-) (SEQ ID NO:4) | CCC CTT TTC TGG AAC AGG AA | 1200-1219 3'-UT |
| G.1225 (-) (SEQ ID NO:5) | TGA GAC AGA GAC GGA GAC AT | 1225-1244 3'-UT |
| G.3-5 (+) (SEQ ID NO:6) | CAG CGC GCG GAG CAG TCT TC | 615-624/ Ex 3/Ex 5 901-910 |
| Classe I (+) | TCC CAC TCC ATG AGG TAT TTC | 81-100 Ex 2 |
| Classe I (-) | TCC AGA AGG CAC CAC CAC AG | 814-833 Ex 4 |

dans lequel Ex. est l'abréviation de exon.

Afin de réduire la quantité de produit amplifié non spécifique, l'amplification est réalisée en utilisant la technique *hot-start* : dans un tube de réaction, 200 µM de chaque dNTP, 0,1 µg de chaque amorce et une pastille d'AmpliWax® (Cetus-Perkin Elmer, France), dans 50 µl d'un tampon PCR 1X, sont incubés à 75°C pendant 5 min ; dans un second tube, 2 µl de la solution de RT ou 1 µg d'ADN génomique et 3,5 U de Taq polymérase (Cetus-Perkin Elmer) dans 50 µl de tampon PCR 1X sont incubés à 95°C pendant 5 min.

Le contenu des 2 tubes est ensuite mélangé et soumis à 35 cycles de PCR dans les conditions suivantes :

94°C pendant 1 minute,
61°C pendant 1 minute,
72°C pendant 1 minute 30.

La dernière étape d'élongation à 72°C est de 10 min.

Les produits PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % et colorés au bromure d'éthidium.

La spécificité des produits obtenus est confirmée par blotting alcalin des fragments (NaOH 0,4 N) sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham, France), puis une hybridation est ensuite réalisée dans un tampon : 5X SSPE, 5X Denhardt, SDS 0,5 %, ADN de sperme de saumon 100 µg/ml, pendant 2 h à 55°C, en présence d'une sonde oligonucléotidique G-1200 marquée au ³²P ([γ-³²P]dATP) et d'un kit de marquage de l'extrémité 5' (Boehringer-Mannheim, France).

Différents contrôles d'amplification sont réalisés : mélange réactionnel RT sans transcriptase reverse M-MLV (RT⁻) et mélange PCR sans matrice d'ADNc (blanc).

Par ailleurs, des contrôles positifs sont réalisés avec des amorces ubiquitaires de la classe I des HLA (voir Tableau I).

c) Résultats :

15

1. Avec les amorces G.526 et G.1225, deux fragments (0,71 kb et 0,43 kb) sont observés après électrophorèse sur gel et coloration au bromure d'éthidium qui s'hybride avec la sonde G1200 (voir figure 1 et figures 2A et B).

20

2. La RT-PCR de l'ARNm du foie fœtal du 2ème trimestre ne montre aucune bande sur le gel, ni aucun signal d'hybridation, alors que l'amplification avec des amorces des HLA de classe I entraîne un signal positif (figure 2C).

L'amplification de l'ADN génomique présente une bande à environ 2,2 kb conformément à la séquence génomique d'HLA-G.

25

3. Le fragment de 0,71 kb correspond au transcrit HLA-G complet tandis que

4. le fragment de 0,43 kb correspond à un transcrit ne contenant pas l'exon 4 (→ 276 bp) (HLA-G4).

Pour confirmer l'absence de l'exon 4, la bande de 0,43 kb est découpée et séquencée selon la méthode suivante :

30

Pour générer des matrices de séquençage, les fragments PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 4 %, coupés et élués avec un tampon acétate d'ammonium 0,5 M et EDTA 5 mM et réamplifiés par PCR asymétrique, de manière à générer des produits simple-brin.

30

Le produit réamplifié est purifié par extraction au phénol-chloroforme, précipité 2 fois avec de l'éthanol, puis séquencé en utilisant le kit de séquençage T7 Sequenase 2.0 (USB/Touzard-Matignon, France).

De plus, les produits de la PCR sont clonés dans le vecteur pPCRII, en utilisant le kit TA Cloning System (Invitrogen, USA), puis séquencés.

35

Comme le montre la figure 3, le fragment de 0,43 kb présente clairement une jonction entre l'exon 3 et l'exon 5, qui résulte de la perte de l'exon 4.

De plus, le séquençage montre que le transcrit conforme à l'invention ne comprend pas l'exon 7 ; la présence d'un codon stop dans l'exon 6 est en outre observée.

40

5. Evaluation de la fréquence du transcrit HLA-G4 :

comme suggéré par la figure 2, l'intensité d'hybridation de la bande de 0,43 kb, correspondant au transcrit épissé, est plus faible que celle correspondant à la copie complète ; ceci suggère que ce transcrit est moins abondant dans la population ARNm d'HLA-G.

45

De manière à évaluer les quantités relatives de ces 2 transcrits, les produits de l'amplification PCR de l'ARNm des trophoblastes du 1er trimestre avec les amorces G.526-G.1225 sont clonés dans le vecteur pPCRII, comme précisé ci-dessus.

Sur 260 clones analysés par hybridation des réplicats, soit avec la sonde G1200, soit avec la sonde G.3-5, environ 210 clones présentent une hybridation positive avec la sonde G.1200 et seulement un clone est positif avec la sonde G.3-5.

50

Ce clone unique a été séquencé, tandis que 5 clones positifs avec la sonde G.1200, choisis au hasard, sont analysés par leur carte de restriction vis-à-vis d'enzymes spécifiques des exons 3 et 4 (voir figure 1).

Une comparaison des séquences montre que le clone positif avec la sonde G.3-5 ne comprend pas l'exon 4, tandis que les 5 autres clones correspondent au transcrit complet.

Ainsi, la fréquence du transcrit conforme à l'invention par rapport au transcrit comprenant la séquence complète peut être estimée à environ 1/200.

55

La sélection de l'amorce G.526 (spécifique de l'exon 3) a permis d'obtenir, lors de l'amplification PCR, la sélection d'un transcrit dépourvu d'exon 4.

L'absence d'exon 4 crée, à la jonction d'épissage un codon GAG (Glu) à la place du codon GAC (Asp) que l'on retrouve dans le transcrit complet.

L'absence d'exon 4 exclut le domaine $\alpha 3$ de la protéine déduite correspondante et confère une nouvelle structure à l'antigène HLA-G, qui peut être exprimé à la surface des cellules trophoblastiques.

Dans cette structure, le domaine $\alpha 2$ et la région transmembranaire sont reliés et peuvent induire des modifications conformationnelles de la protéine de surface.

En particulier, ladite protéine peut présenter une capacité différente de se lier aux peptides.

EXEMPLE 2 : Expression du transcrit HLA-G complet ou du transcrit sans exon 4 dans les cellules mononucléées circulantes périphériques de l'adulte.

La figure 4 montre les résultats de l'amplification PCR obtenue avec les amorces G.257-G.1225, à partir de matrices d'ADNc de cellules mononucléaires périphériques obtenues chez l'homme (sujets mâles).

Une bande de 1 kb est observée en gel d'agarose (Figure 4A) ; une hybridation avec la sonde G.1200 révèle une bande de même dimension (figure 4B).

Conformément à la séquence d'ADNc, cette bande correspond au transcrit HLA-G complet.

Pour confirmer la production de ce transcrit, le produit de la PCR est cloné dans un vecteur pPCRII puis séquencé, selon la méthode exposée ci-dessus.

Le fragment de 1 kb est entièrement homologue avec la séquence HLA-G décrite par SHUKLA et al. (Nucleic Acids Research, 1990, 18, 8, 2189).

L'amplification PCR de l'ADNc à partir d'une population de polynucléaires avec des amorces spécifiques HLA-G génère une bande de faible intensité de même dimension, 0,71 kb, que celle observée avec les cellules mononucléées (contamination de la fraction polynucléaire par des cellules mononucléées).

Pour préciser la spécificité cellulaire de l'expression du gène HLA-G chez les lymphocytes circulants de l'adulte, les populations mononucléaires ont été séparées et une PCR a été réalisée avec des amorces spécifiques HLA-G sur l'ADNc obtenu à partir de sous-populations enrichies en cellules T ou en cellules B.

Une bande de 1 kb est observée pour les fractions cellules T aussi bien en gel d'agarose qu'en analyse par blot après hybridation avec la sonde G.1200 (figures 4A et B) (transcrit complet).

L'utilisation d'une technique PCR *hot-start* a permis de mettre en évidence la présence d'ARNm de HLA-G dans les lymphocytes périphériques de l'adulte, ce transcrit étant présent à la fois dans les cellules B et les cellules T.

Tous les transcrits alternatifs sont observés pour les cellules mononucléées du sang périphérique.

EXEMPLE 3 : Transcrit du gène HLA-G comprenant l'intron 4.

a) Obtention des cellules adultes et des tissus foetaux :

On procède comme à l'exemple 1.

b) Isolement, extraction et amplification par PCR de l'ARN :

L'ARN total est isolé à partir d'1 g de trophoblaste ou de $2 \cdot 10^7$ cellules mononucléées, en utilisant le réactif RNA-Zol B® (Bioprobe système, France), conformément aux recommandations du fabricant.

Pour l'extraction de l'ARN cytoplasmique, les cellules sont lysées 5 min dans un tampon glacé contenant Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, nonidet P40 0,5 % et complexe ribonucléoside vanidyle 10 mM (Sigma Chemical, Saint-Louis).

Les noyaux intacts sont retirés par centrifugation 2 min à 12 000 g et les protéines du surnageant sont dénaturées avec 4 μ l de SDS 20 %, puis digérées avec 2,5 μ l de protéinase K à 20 ml/ml, pendant 15 min à 37°C.

Après des extractions au phénol/chloroforme et au chloroforme, l'ARN cytoplasmique est récupéré par précipitation à l'éthanol en présence d'acétate de sodium 3 M.

La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %, en présence de formaldéhyde.

L'ADNc est préparé à partir de 5 à 10 μ g d'ARN total, en présence d'amorces oligo-dT et de transcriptase réverse M-MLV (Gibco-BRL, Life Technologies) conformément au protocole selon l'exemple 1.

Les amplifications PCR sont réalisées en utilisant la technique *hot start*, en utilisant comme amorces, l'amorce G.526 (spécifique de l'exon 3) et l'amorce G.1225 (spécifique de la région 3' non traduite) et comprennent 35 cycles effectués dans les conditions suivantes :

94°C pendant 1 min, 61°C pendant 1 min 30 et 72°C pendant 2 min. L'absence d'ADN contaminant est vérifiée par une amplification concomitante d'un mélange de PCR sans transcriptase réverse M-MLV (RT-) et

sans matrice (blanc). La spécificité des produits de l'amplification RT est examinée comme décrit ci-dessus à l'exemple 1, à l'aide d'une méthode de Southern, en présence d'une sonde oligonucléotidique G.1200 marquée au ^{32}P .

Pour la détection de l'intron 4, on utilise la sonde oligonucléotidique dénommée G.i4A (5'-GAGGCATCAT-GTCTGTTAGG), de SEQ ID NO: 10 ou la sonde G.i4B 5'-AAAGGAGGTGAAGGTGAGGG, de SEQ ID NO: 11.

Après 2 lavages de 15 min, à température ambiante et 2 lavages de 15 min à 50°C, en présence d'un tampon 2X SSC, SDS à 0,1 %, les taches sont exposées à un film à rayons X Fuji avec des écrans intensifiants à -80°C.

c) Isolement et séquençage des produits de la RT-PCR :

Les produits de la RT-PCR sont clonés dans un vecteur pCR II en utilisant le kit TA *Cloning system* (Invitrogen, San Diego, Californie), comme recommandé par le fabricant.

La transformation est réalisée avec des cellules compétentes DH α 5FIQ et le criblage des clones recombinants HLA-G est réalisé par hybridation des réplicats avec la sonde G.1200. Les inserts sont excisés par digestion par l'enzyme EcoRI et discriminés conformément à leur poids moléculaire sur un gel d'agarose à 1 %.

L'évaluation de la fréquence des transcrits contenant l'intron 4 est déduite à partir du nombre de colonies de réplicats montrant une hybridation positive avec la sonde spécifique de l'intron 4 (G.i4) par rapport au nombre de clones montrant une hybridation positive avec la sonde G.1200.

Pour la détection des exons 4 et 5, on utilise les sondes oligonucléotidiques G.647 (5'-CCACCACCCTG-TCTTTGACT) et G.927 (5'-ATCATGGGTATCGTTGCTGG), respectivement. L'absence d'insertion d'ADN est contrôlée par la sonde oligonucléotidique G.7 (5'-CTAATGTGTCTCTCACGGCT), spécifique de l'exon 7.

Les clones intéressants sont soumis à une PCR asymétrique, pour générer des matrices simple-brin, puis sont séquencés en utilisant le kit de séquençage T7 Séquenase 2.0 (U.S.B. Touzard-Matignon, France), comme illustré ci-après.

d) Résultats :

1) Identification de transcrits épissés alternatifs HLA-G comprenant l'intron 4 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique humain adulte et dans les trophoblastes du premier trimestre :

Le gel d'électrophorèse des produits de la RT-PCR obtenu avec les amorces G.526 et G.1225, obtenus à partir de l'ARN total des cellules mononucléées du sang périphérique adulte mâle, suivi de l'hybridation avec la sonde G.1200, révèle une bande à 0,83 kb, en sus de la bande majeure correspondant à l'ARNm HLA-G1 (0,71 kb) (figure 5).

Ce fragment est encore détecté après l'hybridation des produits de la RT-PCR, à partir de l'ARN cytoplasmique.

Pour caractériser la nature de ce fragment important, le produit total de la RT-PCR obtenu à partir des cellules mononucléées de sang périphérique est cloné dans un vecteur pPCRII, comme précisé ci-dessus. Les clones positifs avec la sonde G.1200 sont analysés par digestion par l'enzyme de restriction EcoRI, sélectionnés pour leur longueur et séquencés.

La séquence démontre que le fragment de 0,83 kb présente un segment additionnel de 122 paires de bases entre l'exon 4 (figure 6A) et l'exon 5 (figure 6B).

La comparaison avec la séquence HLA-G génomique, indique que ce fragment correspond à l'intron 4.

De plus, le séquençage de la région adjacente 3' révèle l'absence d'exon 7 (figure 6C), comme cela a été déjà observé dans d'autres formes d'ARNm d'HLA-G épissé.

Cette nouvelle forme alternative est ci-après dénommée HLA-G5, conformément à la nomenclature sur les transcrits HLA-G (figure 6D).

La recherche du transcrit HLA-G5 dans les trophoblastes du premier trimestre a été réalisée par hybridation en Southern blot, des produits de PCR générés par les amorces G.526-G.1225, en utilisant la sonde oligonucléotidique spécifique de l'intron 4 G.i4A.

La figure 7 montre la présence d'une bande de 2,2 kb (ADN génomique) et d'une bande d'environ 0,83 kb dans tous les tissus examinés (longueur du fragment HLA-G5).

Pour confirmer ce résultat, les produits de PCR des trophoblastes ont été criblés avec la sonde G.i4A après clonage dans le vecteur pPCRII.

Le séquençage de 2 clones positifs a démontré la même organisation que celle obtenue dans les cellules

mononucléées du sang périphérique.

Le transcrit HLA-G6 a également été mis en évidence, par amplification spécifique avec une sonde G-3 (liaison exon 2-exon 4 : 5'ACCAGAGCGAGGCCAACCCC) (SEQ ID NO: 12) et la sonde G.i4B (SEQ ID NO: 11)

2) Estimation de la fréquence des transcrits HLA-G contenant l'intron 4 :

Une première hybridation a été effectuée avec la sonde G.i4A et une seconde hybridation a été réalisée avec la sonde G.1200 sur des réplicats obtenus après clonage du produit de la RT-PCR totale obtenu à partir des trophoblastes du premier trimestre et des cellules mononucléées du sang périphérique adulte, générés par les amorces G.526 et G.1225.

L'absence d'insertion d'ADN génomique a été contrôlée après hybridation des réplicats avec la sonde spécifique de l'exon 7 (G.7) et la présence d'exon 4 et d'exon 5 est démontrée par hybridation avec les sondes G.647 et G.927.

A partir de 437 clones obtenus à partir des cellules mononucléées du sang périphérique et montrant une hybridation positive avec la sonde G.1200, 55 clones se sont révélés être positifs avec la sonde G.i4A ; à partir de 210 clones obtenus à partir des trophoblastes du premier trimestre et montrant une hybridation positive avec la sonde G.1200, 8 clones donnent une hybridation positive avec la sonde G.i4A.

Ces résultats montrent que la fréquence de l'ARNm HLA-G interrompue par l'intron 4 est supérieure dans les cellules mononucléées du sang périphérique dans les trophoblastes : le rapport G.i4/G. 1200 est de 1/8 pour les cellules mononucléées du sang périphérique et de 1/26 pour les trophoblastes.

Il ressort de ces résultats que l'ARNm HLA-G interrompu par l'intron 4 entre les exons 4 et 5 est présent *in vivo* à la fois dans les cellules mononucléées du sang périphérique adulte et dans les trophoblastes humains du premier trimestre avec une abondance supérieure dans le matériel hématopoïétique.

Pour ce qui concerne la protéine HLA-G obtenue avec un tel transcrit, il est important de noter que la séquence d'intron 4 introduit un codon stop au niveau du nucléotide 63 en aval de l'extrémité 3' de l'exon 4.

Un codon stop en amont de l'exon 5 a également été observé. De manière inattendue, un tel transcrit, ne comprenant plus d'exon 5 (région codant pour la protéine transmembranaire) permet d'obtenir des protéines solubles qui sont particulièrement utiles en tant que produit immunotolérant.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

5 (1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA)
 (B) RUE: 31-33 RUE DE LA FEDERATION
 (C) VILLE: PARIS
 (E) PAYS: FRANCE
 10 (F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L' INVENTION: TRANSCRITS DU GENE DE CMH DE CLASSE I HLA-G
 ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 12

15 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

20 (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 9403179
 (B) DATE DE DEPOT: 18-MAR-1994

25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 443 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| CCAATGTGGC TGAACAAAGG AGAGCCTACC TGGAGGGCAC GTGCGTGGAG TGGCTCCACA | 60 |
| GATACCTGGA GAACGGGAAG GAGATGCTGC AGCGCGCGGA GCAGTCTTCC CTGCCCACCA | 120 |
| TCCCCATCAT GGGTATCGTT GCTGGCCTGG TTGTCCTTGC AGCTGTAGTC ACTGGAGCTG | 180 |
| CGGTCGCTGC TGTGCTGTGG AGRAAGAAGA GCTCAGATTG AAAAGGAGGG AGCTACTCTC | 240 |
| AGGCTGCAAT GTGAAACAGC TGCCCTGTGT GGGACTGAGT GGCAAGTCCC TTTGTGACTT | 300 |
| CAAGAACCCT GACTTCTCTT TSTGCAGAGA CCAGCCCACC CCTGTGCCCC CCATGACCCT | 360 |
| CTTYCTCATG CTGAACTGCA TTCCTTCCCC AATCACCTTT CCTGTTCCAG AAAAGGGGCT | 420 |
| GGGATGTCTC CGTCTCTGTC TCA | 443 |

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

5 GGAAGAGGAG ACACCGGAAC A 21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

10 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCAATGTGGC TGAACAAAGG 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

20 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CCCCTTTTCT GGAACAGGAA 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TGAGACAGAG ACGGAGACAT 20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

50 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CAGCGCGCGG AGCAGTCTTC

20

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 72 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

10

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu
1 5 10 15

20

Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala
20 25 30

Glu Gln Ser Ser Leu Pro Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val Ala Gly
35 40 45

25

Leu Val Val Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Ala Ala Val Ala Ala Val
50 55 60

Leu Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp
65 70

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 145 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

35

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu
1 5 10 15

45

Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Met Leu Gln Arg Ala
20 25 30

Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu
35 40 45

50

Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Ile
50 55 60

Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Val Glu Leu
65 70 75 80

55

Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala
85 90 95

Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln

100 105 110

5 His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp Ser Lys Glu Gly
115 120 125

Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser Leu Ser Glu Asp
130 135 140

10 Leu
145

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- 15 (A) LONGUEUR: 117 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

25 Gln Ser Glu Ala Asn Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Val
1 5 10 15

Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro
20 25 30

30 Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln
35 40 45

Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln
50 55 60

35 Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr
65 70 75 80

Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg Trp
85 90 95

40 Ser Lys Glu Gly Asp Gly Gly Ile Met Ser Val Arg Glu Ser Arg Ser
100 105 110

Leu Ser Glu Asp Leu
115

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

55 GAGGCATCAT GTCTGTTAGG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

AAAGGAGGTG AAGGTGAGGG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

ACCAGAGCGA GGCCAACCCC

20

Revendications

1°) Séquence d'ADNc, issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), caractérisée en ce qu'elle comprend successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8), laquelle séquence est dénommée HLA-G4 et est présente aussi bien dans les trophoblastes du premier trimestre que dans les cellules mononucléées circulantes de l'adulte.

2°) Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend successivement de 5' en 3' :

- le fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- le fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- le fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8).

3°) Séquence selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine dans laquelle le domaine $\alpha 2$ et la séquence transmembranaire de HLA-G sont directement joints, en ce qu'elle présente la SEQ ID NO: 1 et en ce qu'elle comprend 0,43 kb.

4°) Produit de transcription du gène HLA-G humain du CMH, caractérisé en ce qu'il inclut, à partir de l'extrémité 5' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5), et
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) de HLA-G et en ce qu'il comprend 0,43 kb.

5°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 2.

6°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 3.

7°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 4.

5 8°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 5.

9°) Oligonucléotide, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de la séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et en ce qu'il présente la SEQ ID NO: 6.

10 10°) Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou un fragment de celle-ci, marquée à l'aide d'un marqueur tel qu'un isotope radioactif, une enzyme appropriée ou un fluorochrome.

11°) Sonde selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente la SEQ ID NO: 6 selon la revendication 9.

15 12°) Sonde selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle présente la SEQ ID NO: 4 selon la revendication 7.

13°) Paires d'amorces pour la synthèse d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que chaque amorce comprend une séquence ou un fragment de séquence selon l'une quelconque des revendications 5 à 9.

20 14°) Paire d'amorces selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de SEQ ID NO: 2 selon la revendication 5, apparié à un oligonucléotide de SEQ ID NO: 5 selon la revendication 8.

15°) Paire d'amorces selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un oligonucléotide de SEQ ID NO: 3 selon la revendication 6, apparié à un oligonucléotide de SEQ ID NO: 5 selon la revendication 8.

25 16°) Utilisation d'une séquence d'ADNc, dénommée HLA-G-5 et issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du CMH de cellules mononucléées circulantes d'adultes, comprenant successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 2$ (exon 3),
- 30 - un fragment codant pour le domaine $\alpha 3$ (exon 4),
- l'intron 4,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8),

35 pour la préparation d'un médicament destiné à une utilisation comme agent immunomodulateur.

17°) Utilisation d'une séquence d'ADNc, dénommée HLA-G-6 et issue d'un ARNm du gène HLA-G humain du CMH de cellules mononucléées circulantes d'adultes, comprenant successivement de 5' en 3' :

- un fragment codant pour le peptide signal (exon 1),
- un fragment codant pour le domaine $\alpha 1$ (exon 2),
- 40 - un fragment codant pour le domaine $\alpha 3$ (exon 4),
- l'intron 4,
- un fragment codant pour le domaine transmembranaire TM (exon 5),
- un fragment codant pour le domaine cytoplasmique (exon 6) et
- le fragment 3' non traduit (exon 8),

45 pour la préparation d'un médicament destiné à une utilisation comme agent immunomodulateur.

18°) Utilisation d'une séquence selon la revendication 16 ou la revendication 17, sans exon 6 et/ou sans exon 8.

50 19°) Procédé d'obtention de protéines solubles immunotolérantes, caractérisé, en ce qu'il comprend la construction d'un vecteur d'expression dans lequel est insérée une séquence avec intron 4, issue de cellules mononucléées circulantes d'adultes, telle que définie à l'une quelconque des revendications 16 à 18 et l'expression desdites protéines solubles.

20°) Peptides ou fragments peptidiques, caractérisés en ce qu'ils sont codés par au moins un fragment selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou 16 à 18.

21°) Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il répond à la SEQ ID NO: 7.

55 22°) Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est codé par un fragment du transcrit HLA-G5 et répond à la SEQ ID NO: 8.

23°) Peptide selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est codé par un fragment du transcrit HLA-G6 et répond à la SEQ ID NO: 9.

24°) Procédé de sélection et d'enrichissement en cellules hématopoïétiques indifférenciées (cellules sanguines immatures ou cellules souches), caractérisé en ce qu'il comprend :

- (a) le prélèvement d'un échantillon sélectionné, selon le cas, parmi le sang périphérique, le sang de cordon ombilical ou la moelle osseuse,
- 5 (b) le mise en contact dudit échantillon avec des anticorps anti-CD34,
- (c) la séparation des complexes cellules contenant un antigène CD34-anticorps anti-CD34 formés,
- (d) la réalisation d'une RT-PCR *in situ* sur les cellules obtenues à l'étape (c) en présence d'amorces marquées à l'aide d'un fluorochrome selon l'une quelconque des revendications 13 à 15,
- (e) la séparation des cellules fluorescentes, obtenues et
- 10 (f) la sélection des cellules non fluorescentes immatures pluripotentes.

25°) Procédé de détection de cellules exprimant le transcrite selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 et
- 15 (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable.

26°) Procédé de détection de cellules sanguines et plus particulièrement de cellules mononucléées circulantes d'adultes, exprimant un transcrite comprenant l'intron 4, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées, conforme à l'invention, sélectionnée parmi les paires (1)-(2) et (3)-(4) selon l'une quelconque des revendications 13 à 15,
- 20 (b) sélection des transcrits comprenant l'intron 4, par hybridation avec une sonde, éventuellement marquée, sélectionnée parmi la sonde de SEQ ID NO: 10 et la sonde de SEQ ID NO: 11 et
- (b) séparation des cellules marquées par tout moyen convenable, notamment par cytofluorométrie.

27°) Anticorps, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les protéines HLA-G selon l'une quelconque des revendications 20 à 23.

28°) Procédé de séparation de cellules foetales nucléées, à partir d'un échantillon de sang maternel, caractérisé en ce qu'il comprend :

- (1) la mise en contact de l'échantillon de sang maternel avec des anticorps dirigés contre les protéines HLA-G selon la revendication 27, et
- 30 (2) la séparation des complexes cellules foetales-anticorps obtenus.

29°) Procédé de séparation spécifique de cellules mononucléées circulantes, caractérisé en ce qu'il comprend, *in situ*, la mise en oeuvre d'une RT-PCR, par :

- (a) mise en contact de cellules sanguines avec une paire d'amorces marquées selon l'une quelconque des revendications 13 à 15 et
- 35 (b) séparation convenable des cellules marquées.

30°) Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend un peptide selon la revendication 20 ou la revendication 21.

31°) Compositions immunotolérantes, caractérisées en ce qu'elles comprennent un peptide selon la revendication 20 ou la revendication 21, associé à un véhicule ou un support convenable du point de vue pharmaceutique.

32°) Utilisation des peptides selon la revendication 22 ou la revendication 23, pour la préparation d'un médicament à activité immunomodulatrice.

33°) Procédé de détection de récepteurs CD8, caractérisé en ce que l'on met en contact des cellules mononucléées avec un peptide selon l'une quelconque des revendications 20 à 23 et en ce que l'on détecte les complexes CD8 peptides par tout moyen approprié.

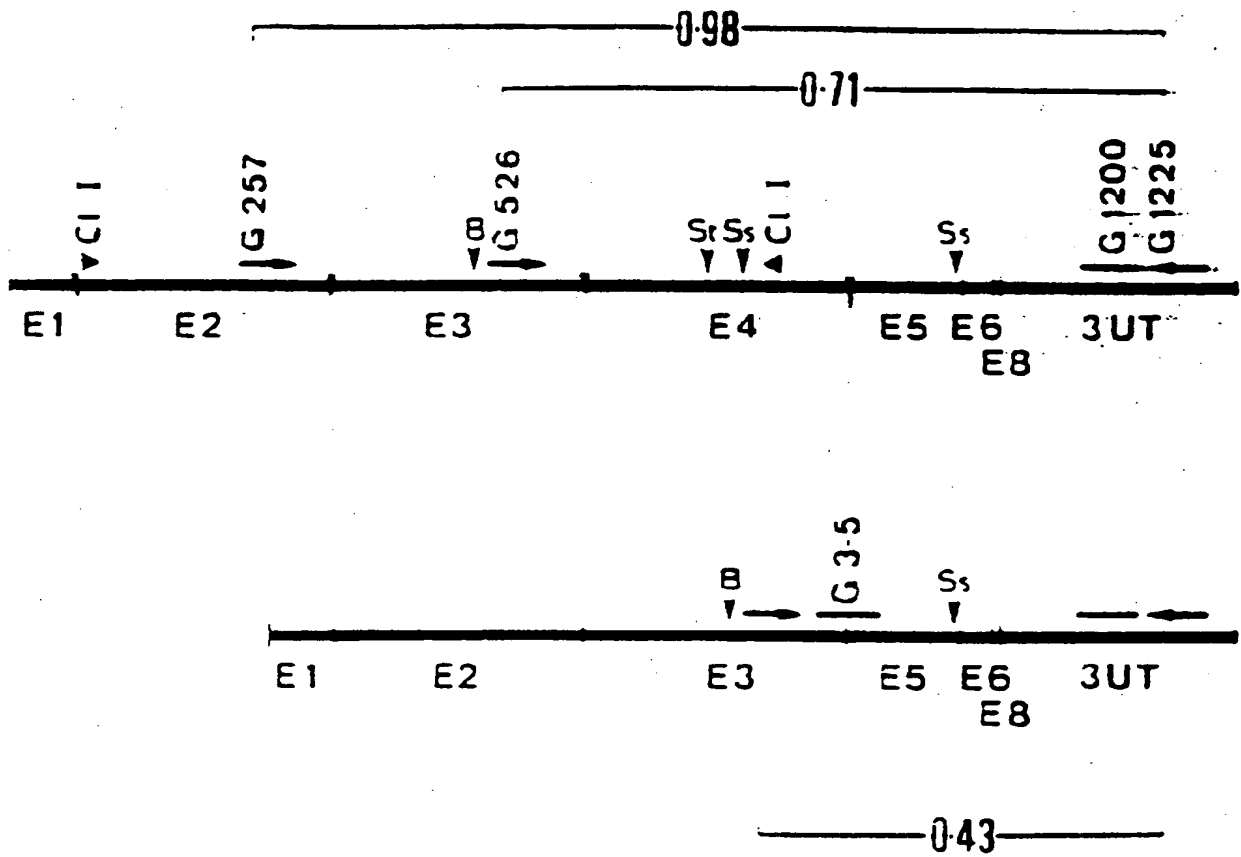


FIGURE 1

TROPHOBLASTES

FOIE FOETAL

ADN

BLANC

M1

M2

+

+

2.2

0.71 —

0.43 →

21

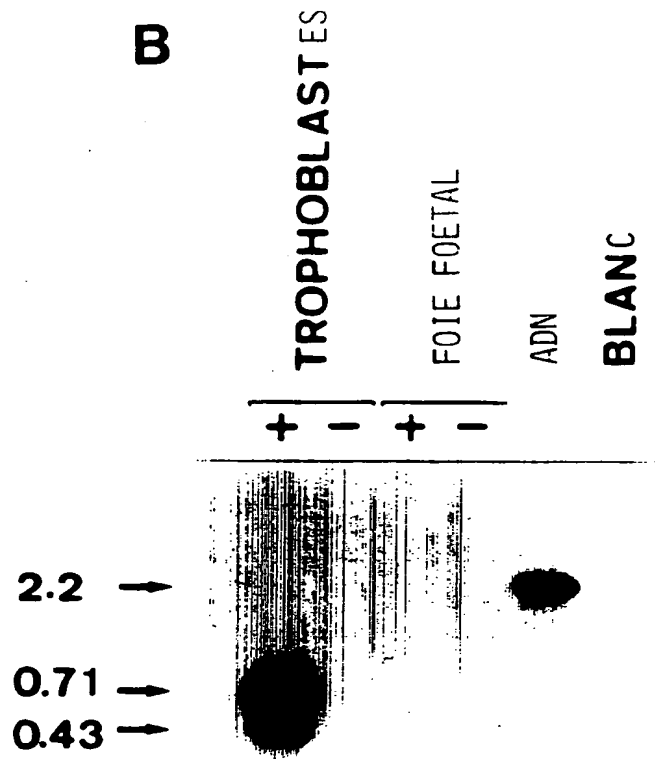


FIGURE 2B

C

| | | | | | | |
|----------------------|----------------------|----------|--------------------|------------|--------------|----------------------|
| M₂ | TROPHOBLASTES | | FOIE FOETAL | ADN | BLANC | M₁ |
| | | + | - | + | - | |



FIGURE 2C

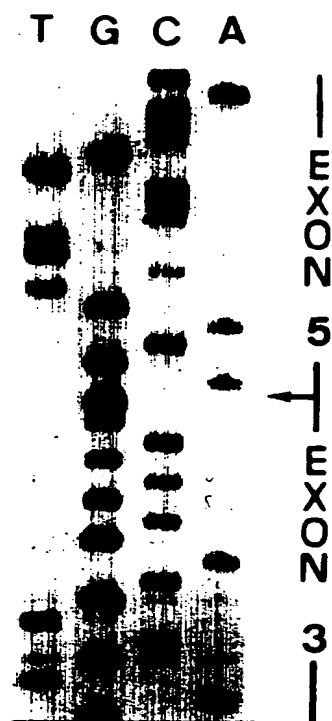


FIGURE 3A

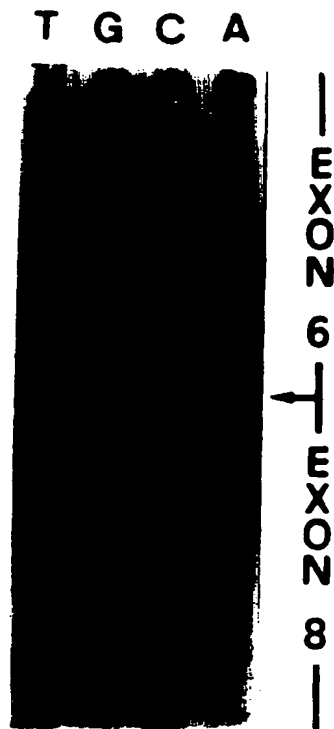


FIGURE 3B

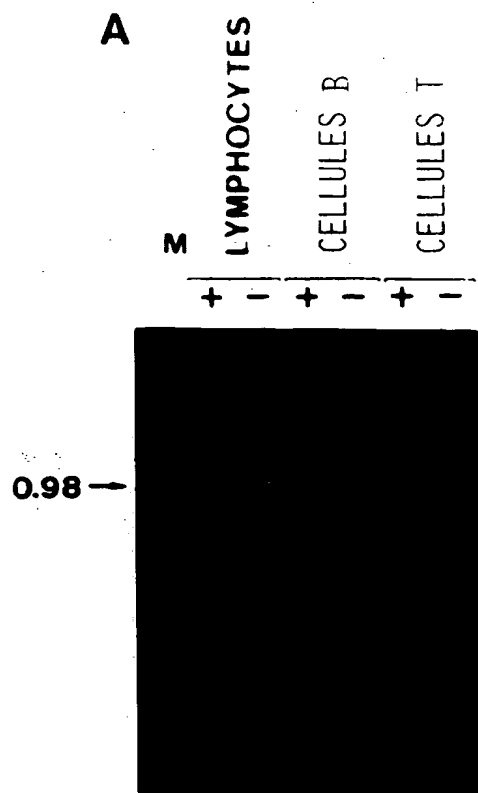


FIGURE 4A

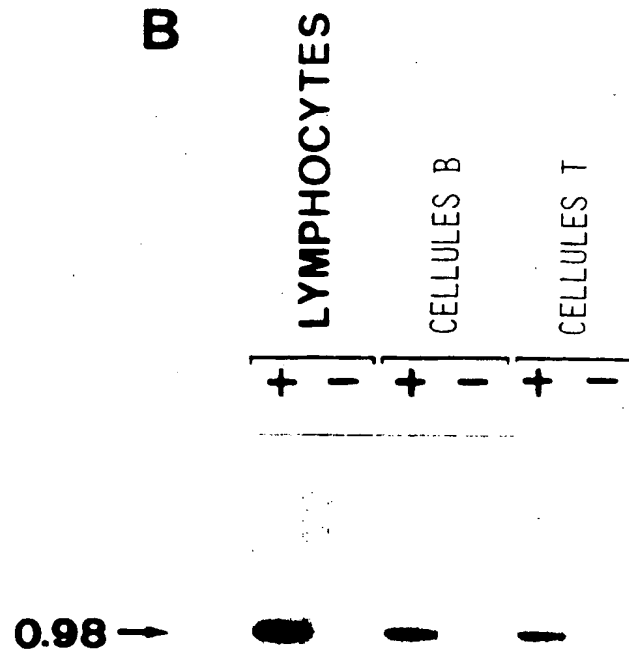


FIGURE 4B

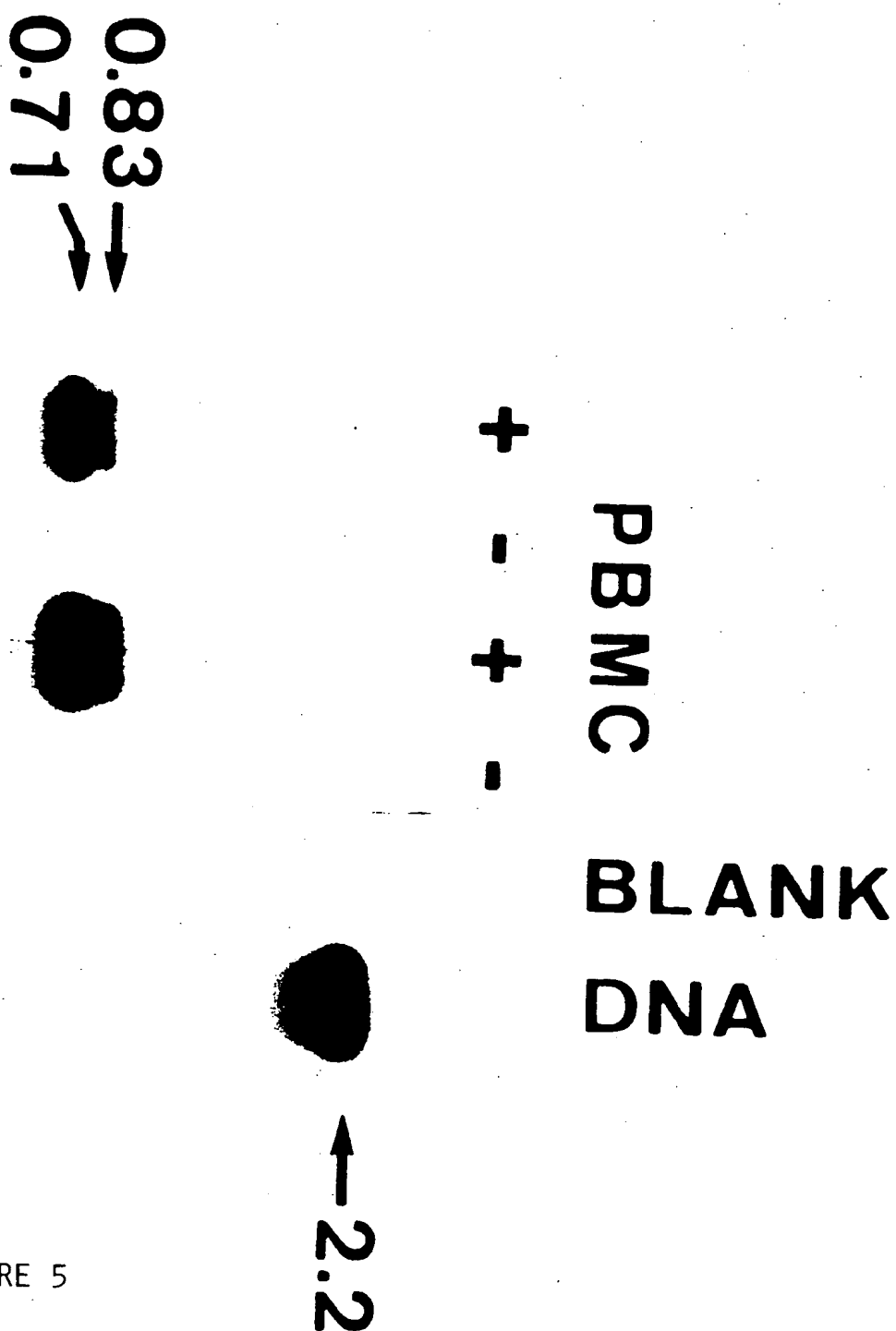
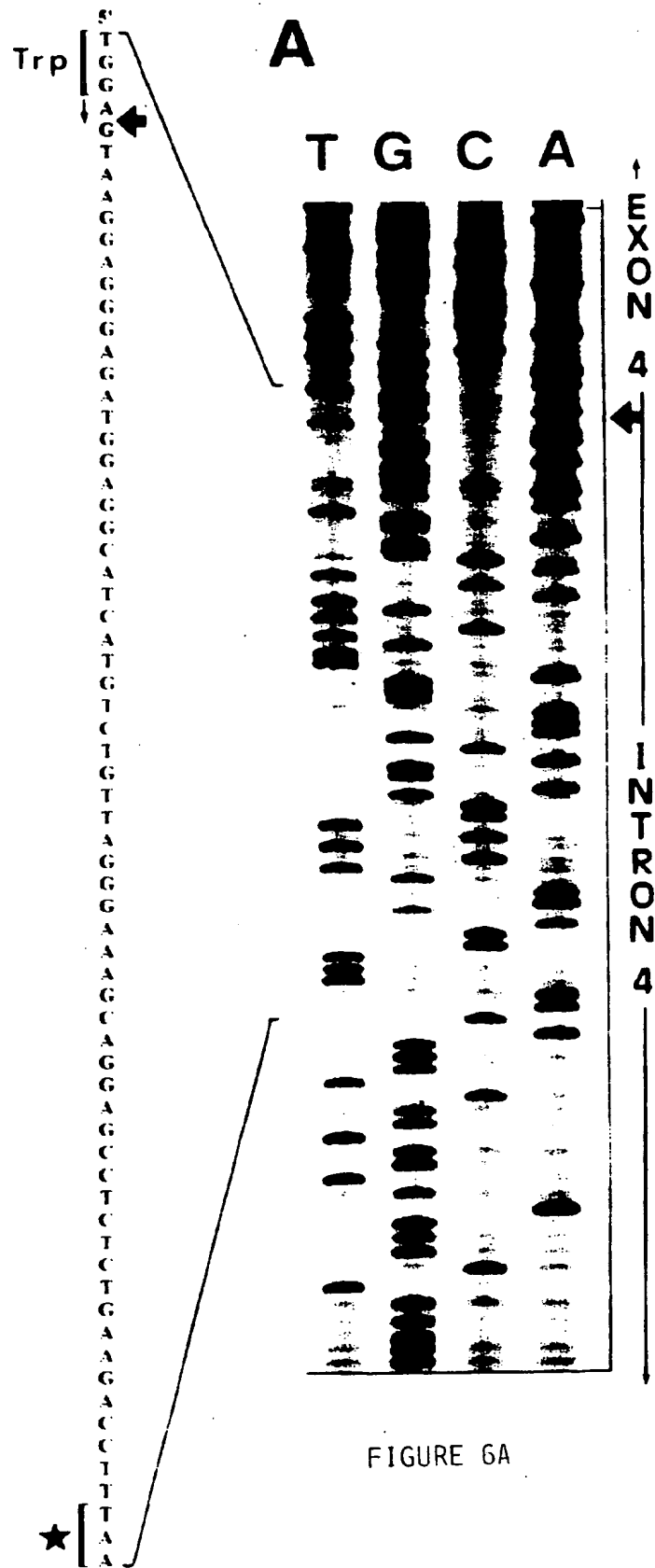


FIGURE 5



B

T G C A

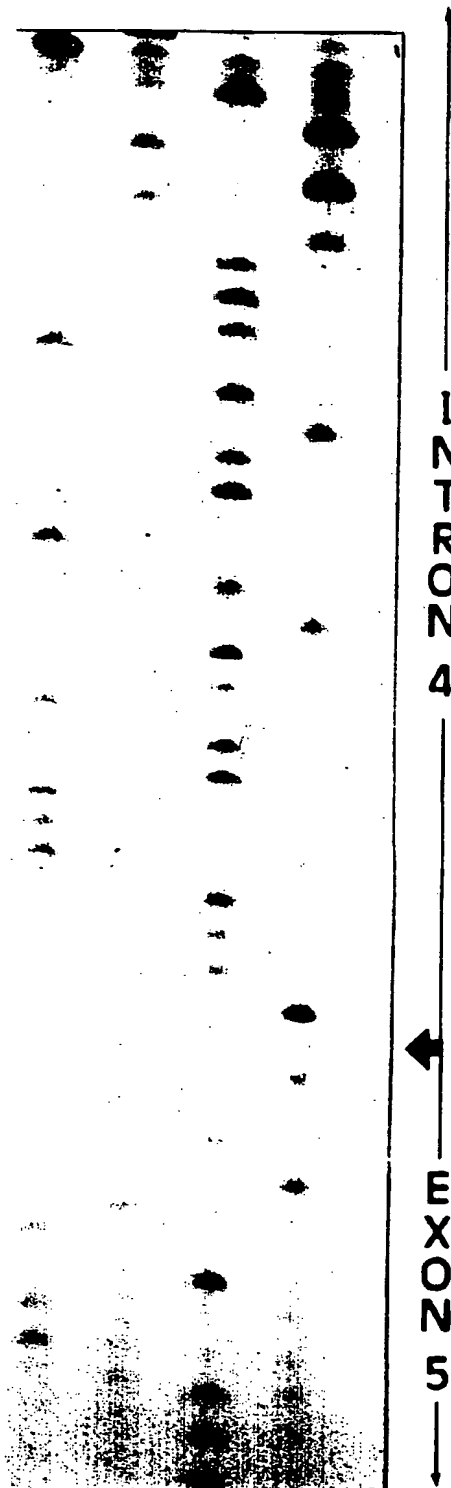


FIGURE 6B

C

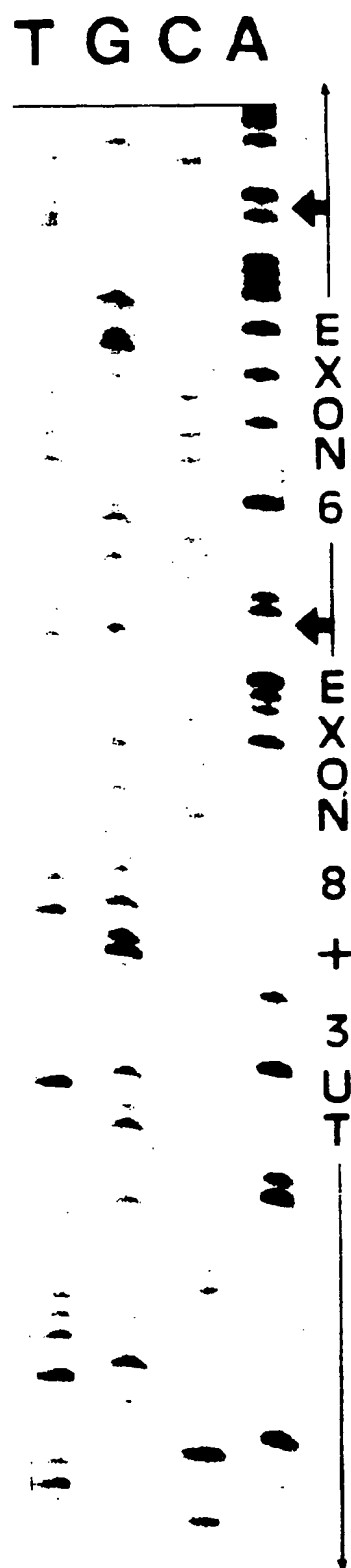


FIGURE 6C

D

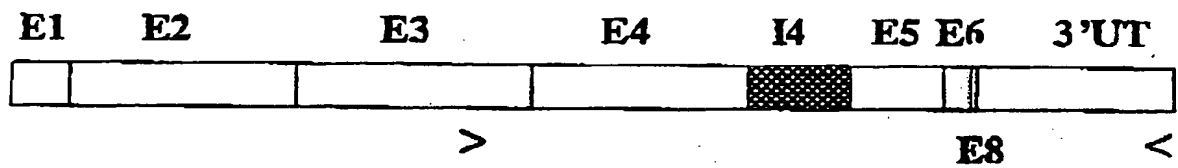


FIGURE 6D

0.83 →



+ + + +

T₁ T₂ T₃ T₁

BLANK
DNA



↑ 2.2

FIGURE 7



Office européen
des brevets

RAPPORT PARTIEL DE RECHERCHE EUROPEENNE

qui selon la règle 45 de la Convention sur le brevet
européen est considéré, aux fins de la procédure ultérieure
comme le rapport de la recherche européenne

Numero de la demande

EP 95 40 0592

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | | |
|--|--|-----------------------------------|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6) |
| D,A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 8, 25 Avril 1990 OXFORD, GRANDE BRETAGNE, page 2189 H. SHUKLA ET AL. 'The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression.' * le document en entier * | 1-15 | C12N15/12 C12Q1/68 C07K14/74 G01N33/569 C07K16/28 A61K38/17 |
| D,A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 89, no. 9, 1 Mai 1992 WASHINGTON DC, ÉTATS UNIS, pages 3947-3951. A. ISHITANI ET AL. 'Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.' * abrégé * * figure 5 * | 1-15, 19-23, 27,28 | |
| | | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) |
| | | | C12N C12Q C07K G01N A61K |
| RECHERCHE INCOMPLETE | | | |
| <p>La division de la recherche estime que la présente demande de brevet européen n'est pas conforme aux dispositions de la Convention sur le brevet européen au point qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications.</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes:</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:</p> <p>Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:</p> <p>Raison pour la limitation de la recherche:</p> <p>voir feuille supplémentaire C</p> | | | |
| Lieu de la recherche | | Date d'achèvement de la recherche | Examineur |
| LA HAYE | | 5 Juillet 1995 | Nooij, F |
| <p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p> | | | |

EPO FORM 1500 (12/92) (P04C08)

RECHERCHE INCOMPLETE

REMARQUE : Bien que la revendication 33 (en partie, pour le cas où une in vivo méthode est revendiquée) concerne une méthode de diagnostic, appliqué au corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets inputés au produits / à la composition.



Office européen
des brevets

**RAPPORT PARTIEL
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numero de la demande
EP 95 40 0592

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6) |
|---------------------------------------|--|----------------------------|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | |
| D,A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 84, no. 24, 15 Décembre 1987 WASHINGTON DC, ETATS UNIS, pages 9145-9149, D. GERAGHTY ET AL. 'A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.' * abrégé * * figures 1,2 * | 1-15 | |
| A | --- CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 5, no. 1, 1993 PHILADELPHIA PA, ETATS UNIS, pages 3-7, D. GERAGHTY 'Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes.' * page 5, colonne de gauche, ligne 6 - ligne 23 * | 1-15 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) |
| A | --- THE FASEB JOURNAL, vol. 4, no. 7, 26 Avril 1990 BETHESDA MD, ETATS UNIS, page A2216 D. GERAGHTY ET AL. 'Production of monoclonal antibodies specific for the new class I antigen HLA-G and their use to examine expression in trophoblast cells.' * résumé 3016 * | 27,28 | |
| | --- -/-- | | |

EPO FORM 1503 01.82 (P04C11)



Office européen
des brevets

**RAPPORT PARTIEL
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

Numero de la demande
EP 95 40 0592

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6) |
|---------------------------------------|---|----------------------------|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | Revendication concernée | |
| A | THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 174, no. 3, 1 Septembre 1991 NEW YORK, NY, ETATS UNIS, pages 737-740, S. SANDERS ET AL. 'Cell-cell adhesion mediated by CD8 and human histocompatibility leukocyte antigen G, a nonclassical major histocompatibility complex class I molecule on cytotrophoblasts.' * le document en entier * | 33 | |
| P,X | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 91, no. 10, 10 Mai 1994 WASHINGTON DC, ETATS UNIS, pages 4209-4213, M. KIRSZENBAUM ET AL. 'An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcripts in adult lymphocytes.' * le document en entier * | 1-15,25 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6) |
| P,X | FOLIA BIOLOGICA, vol. 40, no. 6, 1994 REPUBLIQUE TCHEQUE, pages 431-438, P. MOREAU ET AL. 'HLA-G mRNA forms in human trophoblasts and peripheral blood lymphocytes: Potential use in prenatal diagnosis.' * le document en entier * | 1-15,25 | |

EPO FORM 150 (03.92) (POMCII)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.